

【書類名】 明細書

【発明の名称】 植物に対するストレス耐性付与方法

【発明の詳細な説明】

【発明の属する技術分野】

本発明は、植物に対して優れた乾燥耐性及び/又は高塩濃度耐性等のストレス耐性を付与することができる植物に対するストレス耐性付与方法に関する。

【従来の技術】

地球上の陸地の約3分の1は乾燥地に属し、今後予想される深刻な食糧不足への対策として乾燥地域の農業利用の重要性が認識されるようになってきた。また、現在の技術では過剰な灌漑水による塩類集積や乾燥や高熱により、農耕に不適な乾燥、半乾燥土壌の全体に占める割合が年々増大しており、この問題解決は急務である（石谷 学 他 植物の化学調節 Vol.25, No.2, 149-162, 1990）。この問題に対する解決法としては、これらの環境ストレスに対する耐性機構を解明し、耐性を持つ植物を作出するという方法が挙げられる。

植物は移動の自由を持たないため、自身が置かれた環境の変化を耐え抜いて成長分化を続けていかなければならない。このため植物は環境の変化に速やかに応答して適応する応答機構を、進化の過程で獲得してきたものと考えられる。植物を取り巻く環境因子のうち乾燥や塩類集積は、陸上植物にとって生死に関わる重要な因子であり、また、植物の生長に大きな影響を与える因子となる。植物は乾燥ストレスを受けると成長が阻害され、細胞は膨圧が低下し種々の生理的過程に影響を受ける（Shinozaki and Yamaguchi-Shinozaki, Plant Physiol. 115:327-334, 1997）。

植物においては、これらのストレスに対して個体レベル、組織レベル及び細胞レベルで種々の応答機構が働き、さらに分子生物学的研究により遺伝子発現レベルでも応答していることが明らかにされた。すなわち、種々の植物で乾燥や塩処理により、mRNA 量が増加するストレス誘導性の遺伝子が数多く存在するといった遺伝子発現レベルでの応答機構が明らかとなった。植物は、これらのストレス誘導性遺伝子群の産物のいずれかにより耐性を獲得するものと考えられている。

これらストレス誘導性遺伝子群の発現には、植物ホルモンの一種であるアブシ

ジン酸 (Abscissic acid; ABA)が深く関与しており、植物が乾燥などのストレスを受けると ABA 依存的経路と ABA 非依存的経路によりシグナル伝達され、このシグナル伝達によりストレス誘導性遺伝子群の発現を調節していることが知られている。この遺伝子群には、プロリンやグリシンベタインといった適合溶質の合成に関わるものなどが含まれている。プロリンやグリシンベタインは非常に良く研究が進んでおり、これらの合成系又は分解系を操作して過剰にプロリンやグリシンベタインを蓄積させたトランスジェニック植物で、NaCl や低温のストレスに対して耐性を示すことが知られている。

ところで、RFO の生合成経路は、図 4 に示すように、初めにガラクトキノール合成酵素によってガラクトキノールが合成され、このガラクトキノールとシュクロースを基質としてラフィノース合成酵素によりラフィノースが合成され、さらにガラクトキノールとラフィノースとを基質としてスタキオース合成酵素によりスタキオースが合成される。このラフィノース、スタキオースの総称を RFO という。これまでの RFO に関する報告としては、ラフィノース及びスタキオースが種子の乾燥耐性に重要な役割を果たしていることを示唆するもののみであった(Blackman S. A. et al. Plant Physiol. 100:225-230, 1992, Ooms J.J.J. et al. Plant Physiol. 102:1185-1192, 1993)。

しかしながら、種子ではなく植物体における RFO の機能や役割等に関する報告はなかった。種子と植物体とでは、重複する乾燥耐性獲得機構を持つ場合もあれば、全く別の機構が働いていることもある。

例えば、植物においては、乾燥などのストレスにさらされると先に述べた ABA を蓄積させることによって、気孔を閉鎖し、水分蒸散を抑制することによって過剰な水分の体外流出を防ぐことが知られている。実際に ABA の合成系に変異が生じたシロイヌナズナの ABA 欠損変異株である *aba1* は通常湿度下では生育できないほど萎れやすくなっている。しかしながら、ABA 欠損変異株の種子においては、完全に乾燥しても発芽することが出来る。つまり ABA 欠損変異株の種子における乾燥耐性の低下は認められない(Koornneef, M et al., Physiol. Plant. 61:377-383, 1984, Duckham, S.C. et al., Plant Cell and Environ. 14:601-606, 1991, Rock, C.D. and Zeevaart, J.A.D., Proc.Natl. Acad. Sci. 88:7496-7499,

1991)。

また、シロイヌナズナの ABA 非感受性変異株である *abi3* は、種子の乾燥耐性が失われており、完全に乾燥させると発芽能を失うことが知られているが、乾燥が進む前に播種させた種子では発芽でき、しかも植物体では *abal* のような萎れる表現型は観察されない(Nambara, E., et al, Plant J. 2:435-441, 1992, Kriz, A. R., et al, Plant Physiol. 92:538-542, 1990, Parcy, F., et al, Plant Cell 6:1567-1582)。つまり種子の乾燥耐性獲得については種子のみで機能する ABI3 が ABA よりも遙かに大きい働きを持つことが考えられる。

このように、種子と植物体とでは、乾燥耐性獲得機構に大きな隔たりがあり、種子の乾燥耐性に重要と示唆されている RF0 がそのまま植物体の乾燥耐性にもなんらかの役割を果たしているのかは不明であり、予測すらできないのが現状であった。

【発明が解決しようとする課題】

そこで、本発明は、上述したような実状に鑑み、乾燥及び/又は高塩濃度等の環境ストレスに対して耐性を持つ植物体を作成することを可能とする植物に対するストレス耐性付与方法を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

上述した目的を達成するため本発明者が鋭意検討した結果、植物体内のラフィノース量を増大させることによって、当該植物体にストレス耐性を付与することができるといった知見を得て、本発明を完成するに至った。

すなわち、本発明は以下を包含する。

(1) ラフィノース合成酵素遺伝子を植物体内に導入することを特徴とする植物に対するストレス耐性付与方法。

(2) 上記ラフィノース合成酵素遺伝子は、以下の(a)又は(b)の遺伝子であることを特徴とする(1)記載の植物に対するストレス耐性付与方法。

(a)配列番号1のアミノ酸配列を含むタンパク質をコードする遺伝子。

(b)配列番号1のアミノ酸配列における少なくとも1又は数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を含み、ラフィノース合成活性を有するタンパク質をコードする遺伝子。

(3) 植物体内におけるラフィノース量を増大させることを特徴とする (1) 記載の植物に対するストレス耐性付与方法。

(4) 植物体内におけるラフィノース合成活性を向上させることを特徴とする (1) 記載の植物に対するストレス耐性付与方法。

(5) 植物体内におけるラフィノース量を増大させることを特徴とする植物に対するストレス耐性付与方法。

(6) 植物体内におけるラフィノース合成活性を向上させることを特徴とする植物に対するストレス耐性付与方法。

(7) 以下の(c)又は(d)のタンパク質を、植物内に過剰発現させることを特徴とする植物に対するストレス耐性付与方法。

(c) 配列番号 1 のアミノ酸配列を含むタンパク質。

(d) 配列番号 1 のアミノ酸配列における少なくとも 1 又は数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を含み、ラフィノース合成活性を有するタンパク質。

【発明の実施の形態】

以下、本発明に係る植物に対するストレス耐性付与方法を詳細に説明する。

本発明に係る植物に対するストレス耐性付与方法は、植物体内に例えば、ラフィノース合成酵素をコードする遺伝子（ラフィノース合成酵素遺伝子と呼ぶ）を導入することによって、当該植物体にストレス耐性を付与する手法である。ここで、対象となる植物としては、特に限定されないが、例えば、シロイヌナズナ、ダイズ、ソラマメ、ナタネ、ヒマワリ、ワタ、シュガービート、イネ、サトウキビ、コーン及びソルガム等を挙げることができる。

ここで、ラフィノース合成酵素遺伝子とは、ラフィノース合成酵素活性を有するタンパク質をコードするのであるかぎりいかなるものでも良い。ラフィノース合成酵素活性とは、シュークロースとガラクトキノールを基質としてラフィノースを合成する活性をいう。具体的には、シュークロース及びガラクトキノールを有する反応液に、植物体から抽出したラフィノース合成酵素を含む画分を加えてラフィノース合成反応を行い、反応溶液中に生じたラフィノースを定量することによってラフィノース合成活性を評価することができる。なお、所定時間経過後、例

えば、反応液の4倍量のエタノールを加え、95℃で30秒加熱することによってラフィノース合成反応を停止させることができる。

また、ラフィノース合成酵素遺伝子は、植物体から調製することができる。植物体としては、ラフィノースを合成している植物であればいかなる植物体でもよく、例えば、シロイヌナズナ、ソラマメ、ナタネ、ヒマワリ、ワタ、シュガービート等を挙げるることができる。

ラフィノース合成酵素遺伝子は、GenBankなどのデータベースを用いて、ダイズ由来のラフィノース合成酵素遺伝子（配列番号2）に対し相同性を有する遺伝子を検索することによって、塩基配列情報を得ることができる。ホモロジー解析プログラムはLipman-Pearson法を採用したGENETIX-MAC（遺伝子情報処理ソフトウェア、ソフトウェア開発社）などを用いてもよく、また、インターネット上に公開されているものを使用してもよい。このような方法により得られた塩基配列は遺伝子全長を含む場合と、遺伝子全長を含まない場合がある。遺伝子全長を含まない場合は、目的植物組織より抽出したRNAを鋳型に、ダイズ由来のラフィノース合成酵素遺伝子と相同性の高い部位に対応するプライマーを用い、5' RACE法、3' RACE法にて、容易に全長遺伝子を取得することができる。得られた全長遺伝子は、Soluble Protein Expression System(INVITROGEN 社)や、Tight Control Expression System (INVITROGEN 社)や、QIAexpress System(QIAGEN 社)などのキットが提供する適当な発現ベクターに組み込み、遺伝子を発現させ、記載の方法でラフィノース合成酵素活性を測定し、活性を有するクローンを選抜すればよい。遺伝子の発現方法については、Plant Molecular Biology, A Laboratory Manual (Melody S. Clark (Ed.), Springer)などに詳しく記載されている。

ラフィノース合成酵素遺伝子は、単離したpoly(A)⁺RNAからcDNAライブラリーを調製し、このcDNAライブラリーをハイブリダイゼーションによってスクリーニングすることによって、取得することができる。ハイブリダイゼーションに用いるプローブは、ラフィノース合成酵素の部分アミノ酸配列に基づいて合成されたオリゴヌクレオチドをプライマーとするポリメラーゼ連鎖反応(polymerase chain reaction、以下PCRと称する)によって増幅することに

よって、取得することができる。

以下に、p o l y (A) ⁺RNAからラフィノース合成酵素遺伝子を取得する方法を具体的に説明する。p o l y (A) ⁺RNAの抽出部位としては、ラフィノース合成酵素遺伝子が発現していれば如何なる部位を用いても良い。

全RNAを抽出するには、効率よく損傷の少ないRNAが得られるならば方法は制限されず、例えば、フェノール／SDS法、グアニジンイソチオシアネート／塩化セシウム法等、公知のいずれの方法によっても可能である。こうして得た全RNAからオリゴ(dT)担体を用いてp o l y (A) ⁺RNAを分離できる。また、全RNAを抽出せずにp o l y (A) ⁺RNAを得ることのできるキット(MPG Direct mRNA Purification Kit、CPG, INC.社等)を使用しても良い。

cDNAライブラリーを作製するためには、まずp o l y (A) ⁺RNAを鋳型にし、オリゴ(dT)プライマー、ランダムプライマー等を用い、逆転写酵素によって一本鎖cDNAを合成し、次にグブラーホフマン(Gubler and Hoffman)法、オカヤマバーグ(Okayama-Berg)法(Molecular Cloning 2nd edition, Cold Spring Harbor press, 1989)等により二本鎖cDNAを合成する。ラフィノース合成酵素遺伝子の発現量が少ない場合には、PCRを利用したcDNAライブラリー作製キット(Capfinder PCR cDNA Library Construction Kit(CLONTECH社)等)を用いて、PCRによってcDNAを増幅してもよい。このようにして合成したcDNAは、平滑末端化、リンカーの付加、PCRによる制限酵素サイトの付加等を行うことにより、ファージベクター、プラスミド等のクローニングベクターにクローニングできる。

cDNAライブラリーのスクリーニングに使用するプローブのDNA断片は、PCRを行うことで得ることができる。例えば、ダイズ、キュウリなどの植物における既知のラフィノース合成酵素遺伝子の塩基配列情報を用いて、両方で相同性が高く保存されている領域を求め、その領域をPCRで増幅してプローブとすることができる。また、抽出対象植物のゲノム配列を蓄積したデータベースから該遺伝子のホモログを検索し、抽出対象植物におけるラフィノース合成酵素遺伝子ホモログを同定し、PCRにおけるプライマーを設計することができる。

このように設計して合成したプライマー及びcDNAを用いてPCRを行うこ

とによって、ハイブリダイゼーションに使用するプローブを作製することができる。また、いわゆるRACE法(Rapid Amplification of cDNA End:PCR PROTOCOLS A Guide to Methods and Applications、ACADEMIC press INC.p28~38)を行ってプローブを作製しても良い。プローブのラベルには、ラジオアイソトープ、ビオチン等、種々のものを用いることができるが、ランダムプライミング法でラベルすることが望ましい。また、スクリーニングにはハイブリダイゼーションではなくPCRを用いてもよい。さらに、ハイブリダイゼーションとPCRを組み合わせてもよい。

ラフィノース合成酵素遺伝子のクローニングには、上述した方法以外に下記の方法が挙げられる。

(1) 植物体からラフィノース合成酵素を単離精製し、決定されるアミノ酸配列を基に全塩基配列を化学合成する。

(2) 植物体から染色体DNAを調製し、プラスミドベクター等を用いて染色体DNAライブラリーを作製し、このライブラリーからラフィノース合成酵素遺伝子を、ハイブリダイゼーション又はPCRによって取得する。尚、染色体由来のラフィノース合成酵素遺伝子は、コード領域にイントロンが含まれることが予想されるが、このようなイントロンによって分断されたDNAであっても、ラフィノース合成酵素をコードする限り本発明のDNAに含まれる。

(3) poly(A)⁺RNAを分子量等によって分画し、ホイトジャーム又はウサギ網状赤血球を用いたインビトロ翻訳系に供し、ラフィノース合成酵素活性を有するポリペプチドをコードするmRNAが存在する画分を決定し、それより目的のcDNA断片を作製、取得する。

(4) ラフィノース合成酵素抗体を作製し、タンパク質発現ベクターにcDNAライブラリーを乗せ、適当な宿主に感染させてcDNAがコードするタンパク質を発現させ、この抗体を用いて目的のcDNAをスクリーニングする。

(5) ペプチド断片のアミノ酸配列から適当なプライマーを合成し、RACE法によって、末端を含む配列を増幅し、これをクローニングする。

ラフィノース合成酵素遺伝子を発現させるには、酵素をコードする領域のDNAを種々の発現ベクターに組み込めばよく、詳しくは、Plant Molecular Biolog

y-A Laboratory Manual (M. S. Clark (eds.), Springer) などに記載されている。ベクターとしては、市販の発現ベクターを使用してもよい。発現の確認は、本明細書に記載の方法によって活性を測定することによって行うことができる。

ラフィノース合成酵素遺伝子としては、配列番号 1 のアミノ酸配列を含むタンパク質をコードするもの、又は、配列番号 1 のアミノ酸配列における少なくとも 1 以上のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を含み、ラフィノース合成活性を有するタンパク質をコードするものが挙げられる。また、ラフィノース合成酵素遺伝子としては、配列番号 2 のものが挙げられる。

ラフィノース合成酵素遺伝子は、ラフィノース合成酵素の活性、すなわちガラクトキノールとシュクロースとからラフィノースを生成する活性が損なわれない限り、1 若しくは複数の位置での 1 若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むラフィノース合成酵素タンパク質をコードするものであってもよい。ラフィノース合成活性とは、シュクロースとガラクトキノールを基質としてラフィノースを合成する活性をいう。具体的には、シュクロース及びガラクトキノールを有する反応液に、植物体から抽出したラフィノース合成酵素を含む画分を加えてラフィノース合成反応を行い、反応溶液中に生じたラフィノースを定量することによってラフィノース合成活性を評価することができる。なお、所定時間経過後、例えば、反応液の 4 倍量のエタノールを加え、95℃で 30 秒加熱することによってラフィノース合成反応を停止させることができる。ラフィノース合成活性を有するとは、配列番号 1 または 2 に示されるラフィノース合成酵素が有する活性の 30% 以上、好ましくは 60% 以上、さらに好ましくは 80% 以上、最も好ましくは 90% 以上の活性を保持するものをいう。

アミノ酸配列が改変されたラフィノース合成酵素遺伝子を調製するための当業者によく知られた方法としては、例えば、PCR による *in vitro* 変異導入法が挙げられる（伊沢毅、PCR による *in vitro* mutagenesis、151-158 頁、監修 島本功、佐々木卓治、細胞工学別冊植物細胞工学シリーズ 7 新版植物の PCR 実験プロトコール、秀潤社）。タンパク質におけるアミノ酸の改変は、人為的に行うのであれば、通常、200 アミノ酸以内、好ましくは 100 アミノ酸以内、さらに好ましくは 50 アミノ酸以内、さらに好ましくは 10 アミノ酸以内である。また、塩基配列

の変異によりコードする蛋白質のアミノ酸配列が変異することは、自然界においても生じ得る。このように天然型のラフィノース合成酵素において、1 もしくは複数のアミノ酸が置換、欠失、付加、および／または挿入されたアミノ酸配列を有するタンパク質をコードする遺伝子であっても、ラフィノース合成酵素活性を有するタンパク質をコードする限り、ラフィノース合成酵素遺伝子に含まれる。また、たとえ、塩基配列が変異した場合でも、それが蛋白質中のアミノ酸の変異を伴わない場合（縮重変異）もあり、このような縮重変異体もラフィノース合成酵素遺伝子に含まれる。

配列番号 1 以外のアミノ酸配列を有するタンパク質をコードするラフィノース合成酵素遺伝子は、例えば、配列番号 2 に示したラフィノース合成酵素遺伝子に対して部位特異的変異法によって、特定の部位のアミノ酸が置換、欠失、挿入、付加されるように塩基配列を改変することによっても得られる。また、上記のような改変されたラフィノース合成酵素遺伝子は、従来知られている突然変異処理によっても取得され得る。突然変異処理としては、ラフィノース合成酵素遺伝子をヒドロキシルアミン等でインビトロ処理する方法、及びラフィノース合成酵素遺伝子を保持するエシェリヒア属細菌を、紫外線照射または N-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン (NTG) もしくは亜硝酸等の通常人工突然変異に用いられている変異剤によって処理する方法が挙げられる。

また、上記のような塩基の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位等には、植物体の個体差、品種間差、遺伝子の多コピー化、各器官、組織の違いに基づく場合などの天然に生じる変異も含まれる。

上記のような変異を有するラフィノース合成酵素遺伝子を、適当な細胞で発現させ、発現産物のラフィノース合成酵素活性を調べることにより、配列番号 1 以外のアミノ酸配列を有するラフィノース合成酵素をコードするラフィノース合成酵素遺伝子を得られる。また、変異を有するラフィノース合成酵素遺伝子とストリンジেন্টな条件下でハイブリダイズし、かつ、ラフィノース合成酵素活性を有するタンパク質をコードする DNA を単離することによっても、配列番号 1 以外のアミノ酸配列を有するラフィノース合成酵素をコードするラフィノース合成酵素遺伝子を得られる。ここでいう「ストリンジেন্টな条件」とは、いわゆる

特異的なハイブリッドが形成され、非特異的なハイブリッドが形成されない条件をいう。この条件を明確に数値化することは困難であるが、一例を示せば、相同性が高いDNA同士、例えば50%以上の相同性を有するDNA同士がハイブリダイズし、それより相同性が低いDNA同士がハイブリダイズしない条件、あるいは通常のサザンハイブリダイゼーションの洗いの条件である60℃、1×SSC、0.1%SDS、好ましくは、0.1×SSC、0.1%SDSに相当する塩濃度でハイブリダイズする条件が挙げられる。このような条件でハイブリダイズする遺伝子の中には途中にストップコドンが発生したものや、活性中心の変異により活性を失ったものも含まれるが、それらについては、市販の活性発現ベクターにつなぎラフィノース合成酵素活性を記述の方法で測定することによって容易に取り除くことができる。ラフィノース合成活性を有するとは、配列番号1または2に示されるラフィノース合成酵素が有する活性の30%以上、好ましくは60%以上、さらに好ましくは80%以上、最も好ましくは90%以上のを保持するものをいう。

植物体内に上述したようなラフィノース合成酵素遺伝子を導入することによって、ラフィノース合成酵素を過剰発現するトランスジェニック植物を得ることができる。ラフィノース合成酵素遺伝子を導入する際には、所定のプロモーターの下流に当該ラフィノース合成酵素遺伝子を連結した発現ベクターを構築する。発現ベクターを構築する際には、詳しくは、Plant Molecular Biology-A Laboratory Manual(M. S. Clark(eds.), Springer)などに記載されている方法を適宜使用する。ベクターとしては、市販のものを使用してもよい。また、形質転換の方法としては、特に限定されないが、アグロバクテリウム感染方法(特公平2-58917号公報参照)、エレクトロポレーション方法(特開平5-68575号公報参照)、パーティクルガン法(特開平5-508316号公報参照)等を挙げることができる。特に、アブラナ科植物に対する形質転換は、Plant Cell Reports(1987), 6, 321-325に記載の方法に準じて行うことができる。ダイズに対する形質転換は、Pro. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 145(1989)、TIBTECH, 8, 145(1990)、Bio/Technology, 6, 923(1988)、Plant Physiol., 87, 671(1988)、Plant Physiol., 91, 1212(1992)、Bio/Technology, 6, 915(1988)、Plant Physiol.,

99, 81 (1992)等に記載の方法に準じて行うことができる。イネに対する形質転換は、「モデル植物の実験プロトコール イネ、シロイヌナズナ編」78頁記載の方法に準じて行うことができる。さらに、ラフィノース合成酵素遺伝子の発現の確認は、本明細書に記載の方法によって活性を測定することによって行うことができる。

得られたトランスジェニック植物においては、ストレスに対する耐性が向上している。ここで、ストレスとは、例えば、高塩濃度条件及び/又は乾燥条件を意味する。得られたトランスジェニック植物は蒸散量を抑えることによって、土壤中に水分吸収を抑制することができる。ここで、乾燥条件とは、野生型植物が生育できる環境において湿度、給水が制限された状態で野生型植物の生育が抑制されるような条件を意味する。また、ここで高塩濃度条件とは、特に制限はないが、農業肥料、または、酸性土壌、アルカリ性土壌における塩（例えば、NaCl）を高濃度で含む条件を意味する。

高塩濃度条件及び/又は乾燥条件といったストレスに対する耐性が向上するというのは、野生型植物の生育が抑制される又は生育できないような条件下であっても、生育が抑制される程度が抑えられることを意味する。ここで、生育を評価する方法としては、特に限定されず、例えば、生育速度、草丈、重量、葉面積、花の稔性、花粉稔性、種子重量若しくは収量又はこれらの組み合わせ等を挙げることができる。

なお、トランスジェニック植物としては、ホモ接合体、野生型植物とホモ接合体を戻し交雑したヘテロ後代植物であってもよい。また、野生型植物と比較してヘテロ接合体、ヘテロ接合体と比較してホモ接合体の方がストレスに対する耐性がより向上していることがある。

植物体内にラフィノース合成酵素遺伝子を導入することによって、植物体内のラフィノース量を増大させることができる。ラフィノースは、シュクロースのグルコシル基にガラクトースが $\alpha-1, 6$ 結合したラフィノース族オリゴ糖の一つである。ラフィノースは、ガラクチノールとシュクロースとを基質としてラフィノース合成酵素により合成される。植物体内におけるラフィノース量を測定する際には、先ず、ラフィノースを含む抽出液を植物体から抽出する。抽出液は、植

物体を液体窒素により凍結後、破碎し、これにあらかじめ 80℃に暖めておいた 10ml の 80%エタノールを加えた後、90℃で 10 分間煮出し、この煮出しをさらに二回、合計三回行うことによって得ることができる。

次に、この抽出液を H P L C（高速液体クロマトグラフィー）に供し、ラフィノースを定量する。H P L C に際して、例えば、糖分析システム D X 5 0 0（CarboPac PA1 カラム、パルスドアンペロメトリー検出器（ダイオネクス社製））を用いることができる。このように、植物体からの抽出液に含まれるラフィノース量を定量することによって、当該植物内におけるラフィノース量の増加を検出することができる。

本方法において、ラフィノース量を増大させるとは、同条件で生育した野生型の植物体内におけるラフィノース量と比較して多量のラフィノースを含有することを意味する。具体的に、ロゼット葉において、新鮮重あたりのラフィノース含量が、無処理の野性型植物のレベルに対し、1.1 から 50 倍、好ましくは 2 倍から 30 倍、より好ましくは 5 から 20 倍の程度となることを意味する。更に好ましくは、植物体全体において、新鮮重あたりのラフィノース含量が、無処理の野性型植物のレベルに対し、1.1 から 50 倍、好ましくは 2 倍から 30 倍、より好ましくは 5 から 20 倍の程度となることを意味する。

ここで、植物内におけるラフィノース合成活性を向上させることによって、植物体内のラフィノース量を増大させることができ、その結果、植物に対してストレス耐性を付与することができる。ラフィノース合成活性とは、シュークロースとガラクチノールを基質としてラフィノースを合成する活性をいう。具体的には、シュークロース及びガラクチノールを有する反応液に、植物体から抽出したラフィノース合成酵素を含む画分を加えてラフィノース合成反応を行い、反応溶液中に生じたラフィノースを定量することによってラフィノース合成活性を評価することができる。なお、所定時間経過後、例えば、反応液の 4 倍量のエタノールを加え、95℃で 30 秒加熱することによってラフィノース合成反応を停止させることができる。

また、植物内におけるラフィノース合成活性を向上させるとは、同条件で生育した野性型植物体内のラフィノース合成酵素活性と比較し、新鮮重あたりの活性

若しくは比活性又は葉あたりの活性若しくは比活性を向上させることを意味する。具体的には、ロゼット葉において、新鮮重あたりの活性が、無処理の野性型植物のレベルに対し、1.1から50倍、好ましくは2倍から30倍、より好ましくは5から20倍の程度となることを意味する。更に好ましくは、植物体全体において新鮮重あたりの活性が、無処理の野性型植物のレベルに対し、1.1から50倍、好ましくは2倍から30倍、より好ましくは5から20倍の程度となることを意味する。ただし、野性株における内在性のラフィノース合成酵素活性は、植物種や生育環境によっては検出できない場合がある。その場合、植物内におけるラフィノース合成活性を向上させるとは、検出できる程度の活性を有することを意味する。

植物内のラフィノース合成活性を増加させる方法としては、ラフィノース合成酵素遺伝子を発現可能なベクターに組み込みこれを植物に導入する方法、ラフィノース合成酵素遺伝子を植物の染色体上に導入する方法、ラフィノース合成酵素の上流の酵素であるガラクトキノール合成酵素をコードする遺伝子とともにラフィノース合成酵素遺伝子を発現可能なベクターに組み込みこれを植物に導入する方法、ラフィノース合成酵素の上流の酵素であるガラクトキノール合成酵素をコードする遺伝子とともにラフィノース合成酵素遺伝子を植物の染色体上に導入する方法、染色体上のラフィノース合成酵素遺伝子の発現を増強するような転写因子をコードする遺伝子を植物体に導入する方法などがあげられる。

また、ラフィノース合成酵素遺伝子の発現が向上した変異株をスクリーニングしても良く、具体的には、エチルメタンスルフォネート（EMS）等の化学変異剤を用いてラフィノース合成活性を増加させる方法としては、エチルメタンスルフォネート（EMS）等の化学変異剤を用いて得た変異株より蛋白質を抽出し、ウエスタン解析、あるいは、エライザ（ELISA）などで、ラフィノース合成酵素のタンパク質量の多いものを選抜することでも可能である。

本明細書で引用した全ての刊行物、特許及び特許出願を、特に、W098/49273号公報をそのまま参考として本明細書に取り入れるものとする。

【実施例】

以下、実施例を用いて本発明を更に詳細に説明するが、本発明の技術的範囲は以下の実施例に限定されるものではない。

実施例 1

1. 形質転換用ベクタープラスミドの構築

ダイズ由来ラフィノース合成酵素遺伝子は、国際公開番号 W098/49273 号公報に記載された遺伝子を用いた。形質転換のためのプラスミドは、図 1 に示すように、pBIN19 由来のプラスミド pBI121 (CLONTECH 社製) を利用し、カリフラワーモザイクウイルス 35S プロモータ (図 1 においては「35S-Pro」と記載) と、ノパリン合成酵素遺伝子ターミネター (図 1 においては「Nos-ter」と記載) 間の GUS 遺伝子をダイズ由来ラフィノース合成酵素 cDNA (図 1 においては「Raffinose Synthase」と記載) と置換することにより構築した。

具体的には、ダイズ由来ラフィノース合成酵素をコードする遺伝子を含む塩基配列番号 (配列番号 2) における 1 5 6 番目塩基の開始コドンの上流に XbaI サイトを付加したプライマーと、1 2 6 0 番塩基の SacI サイトを含むプライマーを用いて PCR を行い XbaI-SacI 断片を得た。また、1 2 6 0 番塩基の SacI サイトから、2 4 4 8 番目の終止コドンを含む領域は、2 4 4 8 番目のすぐ後に SacI サイトを付加して増幅させた。ベクター pBI121 は、XbaI、SacI 消化し、GUS 遺伝子を除き、ダイズラフィノース合成酵素 cDNA を鋳型として増幅させた XbaI-SacI 断片及び SacI-SacI 断片とともにライゲーションした。ライゲーションミックスを E. coli HB101 に形質転換し、プラスミドの塩基配列解析を行い、ダイズラフィノース合成酵素 cDNA 配列を有するプラスミドを選抜し pBI121-s SRS とした。

2. 形質転換

上記 1. で調製したベクタープラスミド (pBI121-s SRS) を、トリペアレンタルメイティング法を用いて *Agrobacterium tumefaciens* C58 に導入し、*Agrobacterium tumefaciens* C58/pBI121-s SRS を調製した。得られた *Agrobacterium tumefaciens* C58/pBI121-s SRS を、vacuum infiltration 法を用いてシロイヌナズナ col-0 (LEHLE SEEDS 社製) に形質転換した。

得られた種子は、滅菌処理後、カナマイシン 25 µg/ml を含む選抜培地に播種し形質転換体を選抜した。耐性を示した幼植物はハイポネクス 1000 倍液を含むロッ

クワールに定植し、22℃、12時間照射下で順化栽培した。なお、シロイヌナズナの形質転換法と薬剤耐性株の選抜方法は、「モデル植物の実験プロトコル イネ、シロイヌナズナ編（監修 島本功、岡田清孝）」（秀潤社）記載の方法を用いた。

得られた形質転換体5系統（SRS-1～4と称する）について、下記のプライマー1及びプライマー2及びゲノムDNAを用いたPCRにより遺伝子の導入を確認した。

プライマー1：5'-TTT CCG GTT CAA GTT ATG GT-3'（配列番号3）

プライマー2：5'-CAA TGC ATC CGT TAT CAG TA-3'（配列番号4）

鋳型となるゲノムDNAは、薬剤耐性を指標に選抜した形質転換体候補株のT2世代の葉よりPlant DNeasy DNA抽出キット（QUIAGEN社製）を用いて精製した。PCRは、97℃1分の熱変性工程後、95℃15秒、56℃15秒及び72℃60秒を1サイクルとして30サイクルとするプログラムとした。PCR後、増幅されたDNA断片をアガロースゲル電気泳動で確認した。

3. 形質転換植物における導入遺伝子の発現解析

形質転換植物SRS-1～5における、ダイズ由来ラフィノース合成酵素遺伝子の発現を、ノーザンハイブリダイゼーション、ウエスタンブロット解析により確認するとともに、形質転換植物におけるラフィノース合成活性を検討した。

<ノーザンハイブリダイゼーション解析>

まず、T3世代植物体の葉より全量RNAを抽出精製した。RNAの抽出には、RNeasy Plant Mini Kit（キアゲン社製）を用いた。抽出したRNAは、各々20μgを変性ゲルにて電気泳動し、HybondN⁺に転写した。プローブとしては、pBI121-s SRSを鋳型として上記プライマー1及びプライマー2を用いたPCRを行い、増幅したDNA断片を用いた。増幅したDNA断片にはAlphasDirect（アマシャムファルマシアバイオテク社製）を用いてラベルした。HybondN⁺に対するプローブのハイブリダイゼーションは、60℃で、一晩行い、60℃に加温した緩衝液でキットプロトコルに従って洗浄した。CDP-Star（ファルマシアバイオテク社製）を用いて、ハイブリダイズしたプローブを検出した結果を図2に示す。なお、図2において、

レーン 1 は野生型、レーン 2 は SRS-1、レーン 3 は SRS-2、レーン 4 は SRS-3、レーン 5 は SRS-4 を示している。

<ウエスタンブロット解析>

まず、ダイズ由来ラフィノース合成酵素抗体を調製するため、大腸菌内でダイズ由来ラフィノース合成酵素を発現させた。

大腸菌内でダイズ由来ラフィノース合成酵素を発現させるための発現用プラスミドは以下のように構築した。すなわち、まず、ダイズ由来ラフィノース合成酵素 cDNA を pET16b ベクターの NdeI、BamHI サイトへクローニングした。次に、配列番号 2 に示した塩基配列における開始コドン 156～158 番目の A T G に Nde I サイトを付加するとともに 579～581 番目の Xho I サイトを含む断片を PCR にて増幅し、SRS cDNA の Xho I -BamH I 断片とともに、pET16b (NOVAGEN 社製) の NdeI、BamH I サイトへクローニングした。次に、終止コドンの後ろに BamH I サイトを付加した BamH I -BamH I 断片を PCR にて増幅し、SRSNde I -BamH I 断片をつないだ pET16b の BamH I サイトへクローニングした。構築したプラスミドは塩基配列解析を行い、正しいダイズ由来ラフィノース合成酵素塩基配列を有するクローンを選抜した。得られたプラスミドは pET16bSRS とした。このプラスミド pET16bSRS を E.coli BL21(DE3)pLysS(Stratagene 社製)に形質転換し、形質転換した大腸菌を -80°C にて保存した。

E.coli BL21(DE3) pLys/pET16bSRS は、 $50\mu\text{g/ml}$ カルベニシリンを含む LB 培地で一晩前培養し、これを 0.1ml とり 50ml の培地に植菌し、約 3 時間培養後、最終濃度 1mM IPTG を添加し、さらに 3 時間培養した。この培養液を 8000rpm 、20 分間の遠心分離して菌体を集め、これを B-PER キット(ピアス社製)にて処理し、可溶性画分、不溶性画分を得た。SDS-PAGE にてダイズ由来ラフィノース合成酵素の発現を確認したところ、ダイズ由来ラフィノース合成酵素は不溶性画分に存在していた。

不溶性画分を、 8M 尿素で溶解し、His-Ttrap (ファルマシアバイオテック社製) カラムにて、ダイズ由来ラフィノース合成酵素-HisTag 融合タンパク質を精製した。これをウサギに免疫することにより、ダイズ由来ラフィノース合成酵素抗体

を得た。

このように得られたダイズ由来ラフィノース合成酵素抗体を用いて以下のようにウエスタンブロット解析を行った。すなわち、まず、解析対象の植物体を液体窒素下で、乳鉢にて磨砕し、抽出ブッファ―(50mM Tris-HCl, 5mMDTT, 1mM PMSF, 0.1% PolyclarAT, pH7.0)にて抽出した。抽出液は、ミラクロス (Calbiochem 社製) にて濾過し、ろ液を冷却遠心し、遠心上清を PD-10 カラム (ファルマシアバイオテク社製) にかけて、低分子を除き、セントリプレッ プ 10 (amicon 社製) にて濃縮し粗抽出液とした。この粗抽出液を SDS-PAGE に供した。

SDS-PAGE には、マルチゲル 7.5% (第一化薬社製) を用いた。電気泳動後、PVDF membrane (BIORAD 社製) にエレクトロブロッティングした。ウエスタンブロット解析は、アンプリファイド AP イミューンブロットキット (BIORAD 社製) を用いた。シロイヌナズナ Col-0 ではシロイヌナズナ由来のラフィノース合成酵素のバンドが、ダイズ未熟種子ではダイズ由来ラフィノース合成酵素のバンドが検出され、形質転換体 (SRS-1~4) では、両方のバンドが検出された。

<形質転換植物におけるラフィノース合成活性の検討>

上記ウエスタンブロット解析の際に得られた粗抽出液を用いて、形質転換植物におけるラフィノース合成活性を検討した。ラフィノース合成活性は、粗抽出液を以下の組成の酵素反応液に加え、ラフィノースを定量した。最終濃度が下記の組成になるように調製した反応液に 10~50 μ l の粗抽出液を添加して全量を 100 μ l とし、32°C で 60~120 分間、ラフィノース合成反応を行った。

反応液組成

- 2.5 mM シュクロース (ナカライテスク社製)
- 5.0 mM ガラクチノール (和光純薬社製)
- 5.0 mM DTT (ナカライテスク社製)
- 20.0 mM トリス塩酸緩衝液 (pH7.0) (ナカライテスク社製)

所定時間経過後、反応液の 4 倍量のエタノールを加え、95°C で 30 秒加熱しラフィノース合成反応を停止させた。次に、反応液を遠心し、遠心上清を減圧乾固した後蒸留水に溶解し、糖分析システムにて反応液中のラフィノースを定量した。

糖分析システムとしては、ダイオネクス社 DX500、カラムとしては CarboPac PA1(4×250) (ダイオネクス社製)、検出器としては PAD (ダイオネクス社製) を用いた。結果を表 1 に示す。

【表 1】

4. 形質転換植物の乾燥耐性

上記 3. でダイズ由来ラフィノース合成酵素を発現するシロイヌナズナにおける乾燥耐性を評価した。

上記 3. で得られた形質転換植物の種子及び野生型の種子を滅菌し、下記の組成を有する GM 寒天培地プレートに播種し、22℃、12 時間照明下で培養した。

GM 寒天培地組成 (pH5.7(KOH))

1 L Murashige-Skoog 塩培地 (シグマ社製)

1ml×1000 B5 ビタミン溶液 (シグマ社製)

0.5g MES (ナカライテスク社製)

30g スクロース (ナカライテスク社製)

8g 培地用寒天 BA30 (伊那食品工業社製)

GM 寒天培地プレートは、上記組成を混合し、オートクレーブにより滅菌後、直径 9 cm のシャーレに分注して作製した。

GM 寒天培地プレート上で発芽した後、3 週間の植物体を 1000 倍ハイポネクスで湿らせたメトロミクス 350 を入れた鉢 (直径 8cm、高さ 6cm のビニルポット (T0-8)) に定植した。植物体の定植数は 1 鉢あたり 7 個体とした。この鉢をバットに入れ、乾燥を防ぐため、3 日間サランラップ (旭化成社製) で覆い、その後、当該サランラップを除いた。バットには 1cm の高さで 1000 倍ハイポネクスを加え、水位の低下に応じ水を足した。

移植の 1 週間後、鉢をキムタオルの上に 30 分置き、鉢の水分をできるだけ除去した。その後、鉢は乾燥したバットに入れ、乾燥処理を行った。乾燥処理から 3 週間後の植物体の様子を図 3 に示した。図 3 から判るように、形質転換体では、野生型と比較して優れた乾燥耐性を示すことが明らかとなった。このことから、植物体内にラフィノースを多量に発現させることによって、植物体に優れた乾燥耐性を付与することができることが明らかとなった。

【発明の効果】

以上詳細に説明したように、本発明によれば、植物体内にラフィノースを多量に発現させることによって、当該植物体に対してストレス耐性を付与することができる。したがって、本発明によれば、各種環境ストレスに対して耐性を持つ植物体を作出することが可能となる。

【配列表フリーテキスト】

配列番号 3, 4 は合成プライマーである。

【図面の簡単な説明】

【図 1】

ダイズ由来ラフィノース合成酵素遺伝子を有する形質転換用ベクタープラスミドの概略構成図である。

【図 2】

ダイズ由来ラフィノース合成酵素遺伝子の発現を解析するノーザンハイブリダイゼーションの結果を示す電気泳動写真である。

【図 3】

乾燥条件下における形質転換植物の生育状態を示す写真である。

【図 4】

RF0 合成経路を示す模式図である。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 ラフィノース合成酵素遺伝子を植物体内に導入することを特徴とする植物に対するストレス耐性付与方法。

【請求項 2】 上記ラフィノース合成酵素遺伝子は、以下の(a)又は(b)の遺伝子であることを特徴とする請求項 1 記載の植物に対するストレス耐性付与方法。

(a)配列番号 1 のアミノ酸配列を含むタンパク質をコードする遺伝子。

(b)配列番号 1 のアミノ酸配列における少なくとも 1 又は数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を含み、ラフィノース合成活性を有するタンパク質をコードする遺伝子。

【請求項 3】 植物体内におけるラフィノース量を増大させることを特徴とする請求項 1 記載の植物に対するストレス耐性付与方法。

【請求項 4】 植物体内におけるラフィノース合成活性を向上させることを特徴とする請求項 1 記載の植物に対するストレス耐性付与方法。

【請求項 5】 植物体内におけるラフィノース量を増大させることを特徴とする植物に対するストレス耐性付与方法。

【請求項 6】 植物体内におけるラフィノース合成活性を向上させることを特徴とする植物に対するストレス耐性付与方法。

【請求項 7】 以下の(c)又は(d)のタンパク質を、植物内に過剰発現させることを特徴とする植物に対するストレス耐性付与方法。

(c)配列番号 1 のアミノ酸配列を含むタンパク質。

(d)配列番号 1 のアミノ酸配列における少なくとも 1 又は数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を含み、ラフィノース合成活性を有するタンパク質。

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 乾燥等の環境ストレスに対して耐性を持つ植物体を作成することを可能とする。

【解決手段】 植物体内のラフィノース量を増大させることによって、当該植物体にストレス耐性を付与する。

【選択図】 なし

2017年10月10日